Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Die chemische Zusammensetzung menschlicher Zwischenwirbelscheiben in Abhängigkeit vom Lebensalter

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Matthias Sziegoleit
aus Insterburg

1963

7636

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität
Tübingen
Direktor: Professor Dr.Dr. G. Weitzel

Die chemische Zusammensetzung menschlicher Zwischenwirbelscheiben in Abhängigkeit vom Lebensalter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Matthias Sziegoleit
aus Insterburg
1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

D e k a n : Professor Dr.Dr.E.Fröhlich

1. Berichterstatter: Professor Dr.E.Buddecke

2. Berichterstatter: Professor Dr.E.Lembeck

Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

EINLEITUNG

A. Morphologie und pathologische Anatomie 2

B. Chemische Untersuchungen an Zwischenwirbelscheiben . . 3

MATERIAL UND METHODIK

A. Untersuchungsgut 5

B. Analysen 6

C. Isolierung und präparative Darstellung der Mucopolysaccharide

1. Gesamtmucopolysaccharide, saure Mucopolysaccharide und Glycoproteide 7
2. Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide durch Säulenchromatographie
   a) analytischer Maßstab 8
   b) präparativer Maßstab 9

ERGEBNISSE

1. Bindegewebsanalysen des lipidfreien Discustrockengewebes. Altersveränderungen des Kollagen-, Hexosamin- und Mineralgehaltes 11
2. Isolierung, chemische Zusammensetzung und Altersveränderung der Gesamtmucopolysaccharide 14
3. Isolierung und chemische Identifizierung der sauren Mucopolysaccharide 16
4. Veränderungen des Spektrums der sauren Mucopolysaccharide in Abhängigkeit vom Lebensalter 23
5. Chemische Zusammensetzung der Glykoproteide 29

DISKUSSION 31

ZUSAMMENFASSUNG 36

LITERATUR 39

Das Interesse an der Chemie des Bindegewebes hat in den letzten Jahren zugenommen. Dies hängt vor allem mit der Erkenntnis zusammen, daß das Bindegewebe neben mechanischen und Stützfunktionen auch für vielfältige physiologische Vorgänge wie Wasser- und Elektrolythaushalt oder Diffusionsvorgänge im Zwischenzellraum von Bedeutung ist. Die chemische Zusammensetzung des Bindegewebes ist daher je nach Lokalisation und Funktion - einmal den jeweiligen mechanischen Anforderungen, zum anderen speziellen physiologischen Vorgängen angepaßt. Das Interesse der Pathologie am Bindegewebe beruht auf der Tatsache mannigfacher z. T. generalisierter Erkrankungen des Bindegewebes der sog. "Kollagenosen". Untersuchungen der letzten Jahre haben zudem ergeben, daß die Zusammensetzung des Bindegewebes ein charakteristischer Indikator für die im Organismus ablaufenden Altersveränderungen ist.

Ein Bindegewebe, an dem sich diese Zusammenhänge besonders instruktiv aufzeigen lassen, sind die Zwischenwirbelscheiben. Als geformtes Bindegewebe, das einen seiner speziellen Funktion und Lokalisation entsprechenden Differenzierungsgrad erreicht hat, besitzt es vorwiegend mechanische Aufgaben. Durch Bildung eines formkonstanten, inkompressiblen Flüssigkeitskissens sind die Zwischenwirbelscheiben besonderen statischen Beanspruchungen gewachsen und zum elastischen Abfangen von Druckbelastungen geeignet. Mit Änderung und Abnahme ihrer Funktionsfähigkeit im Laufe des Lebens lassen sich auch charakteristische mit chemischen Methoden meßbare Altersveränderungen nachweisen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einer chemischen Analytik des Bindegewebes der Zwischenwirbelscheiben. Dabei sollten einmal die noch fehlenden Daten über die Zusammensetzung der Zwischenwirbelscheiben des gesunden und erwachsenen Menschen gewonnen werden. Ferner war zu prüfen, ob sich im Laufe des Alters bestimmte chemische Gesetzmäßigkeiten in der Veränderung des Bindegewebes der Zwischenwirbelscheiben nachweisen lassen.

A. Morphologie und pathologische Anatomie (1, 2, 3)

Histologisch zeigen die Zwischenwirbelscheiben den allgemeinen Bauplan eines Bindegewebes: Neben den quantitativ nur in geringer Menge vorhandenen zellulären Elementen besteht die Hauptgewebsmenge aus kollagenen, meist spiralig von Wirbel zu Wirbel ziehenden Fibrillen, die in eine amorphe interstitielle Grundsubstanz eingebettet sind. Durch Vorhandensein eines zentralen, vorwiegend aus Grundsubstanz bestehenden Gallertkernes (nucleus pulposus), um den sich die Fasern in enger Beziehung zu dessen Gestalt und Lage orientieren und einem aus dichteren Fibrillen bestehenden peripheren Faserring, der durch eine fibrilläre Kapsel geschlossen ist und cranial und caudal durch eine Schlußplatte aus verkalktem Knorpel begrenzt wird, besitzt die Zwischenwirbelscheibe einen inhomogenen Bau. Allerdings vermag die Elektronenmikroskopie (4) nachzuweisen, daß auch der gesunde gelatinöse nucleus pulposus von einem dreidimensionalen Gittersystem durchsetzt wird. Die elektronenoptische Ultrastruktur der Zwischenwirbelscheibe zeigt weiterhin eine enge Beziehung zwischen Fasern und Grundsubstanz und die gleichförmige Ausbreitung auch zwischen den dicht gelagerten Fibrillen der Peripherie

Die morphologischen Altersveränderungen (5, 6) sind einmal durch Spalten- und Höhlenbildung des nucleus pulposus sowie eine generelle Abnahme der Grundsubstanz gekennzeichnet, woraus eine Abnahme des Gesamtwassergehaltes resultiert; zum anderen erfolgt ein Faserumbau mit Umwandlung von Reticulinfasern in kollagene Bündel. Die Grundsubstanzabnahme führt zu einer auch elektronenoptisch nachgewiesenen Demaskierung der kollagenen Fibrillen.

Die histologischen und elektronenoptischen Befunde werden durch histochemische Untersuchungen ergänzt. Ihr wesentliches Ergebnis ist der Nachweis metachromatischen Materials (4, 5, 6), das histotopochemisch der strukturlosen Grundsubstanz entspricht. Die relative Unspezifität dieser Nachweisreaktion läßt jedoch keine schlüssigen Aussagen darüber zu, ob es sich überhaupt und gegebenenfalls um bestimmt saure Mucopolysaccharide handelt; doch konnte die ursprüngliche Annahme eines reichlichen Vorkomme

von Hyaluronsäure (7) besonders im nucleus pulposus dadurch widerlegt werden, daß das metachromatisch positive Material keine Empfindlichkeit gegenüber Testeshyaluronidase besaß. Gegen das Vorkommen von Hyaluronidase sprach ebenfalls die erst später getroffene Feststellung, daß reine Hyaluronsäure keine metachromatische Eigenschaften besitzt (8).

B. Chemische Untersuchungen an Zwischenwirbelscheiben

Im Gegensatz zu den umfangreichen und relativ abgeschlossenen descriptiven morphologischen Befunden sind die Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung menschlicher Zwischenwirbelscheiben noch lückenhaft. Eine Reihe einzelner chemischer Befunde und die quantitative Bestimmung verschiedener Grundbausteine geben allerdings wichtige Anhaltspunkte. 1952 wurde aus Zwischenwirbelscheiben junger Kälber durch Extraktion mit Neutralsalzen bzw. Alkali Präparate gewonnen, deren analytische Zusammensetzung derjenigen von Chondroitinsulfat entsprach (9). Der daraus gezogene Schluß, daß die Polysaccharide der Grundsubstanz der Zwischenwirbelscheiben vorwiegend aus Chondroitinsulfat bzw. verschiedener Chondroitinsulfat-Isomeren bestehen müsse, wurde durch Nachuntersucher bestätigt (10, 11, 12). Dabei wurde festgestellt, daß der Gesamtmucopolysaccharid-Gehalt etwa 30 % des Trockengewichtes ausmacht und neben den Chondroitin sulfat-Isomeren A und C auch Keratosulfat vorhanden ist. Die Existenz von Keratosulfat, die bereits auf Grund der Verteilung von Glucosamin und Galaktosamin im nucleus pulposus (11) vermutet wurde, wurde durch präparative Isolierung und Fraktionierung an der Cellulosesäule mit Gewinnung einer Fraktion, die als Kohlenhydrat ausschließlich Glucosamin und Galaktose enthielt, bestätigt, und wurde im Hinblick auf die übrigen analytischen Werte als für die Existenz von Keratosulfat beweisend angesehen (12). Zu ähnlichen Ergebnissen führten Versuche einer Fraktionierung der Bandscheibenpolysaccharide. Durch Extraktion mit Calciumchlorid bzw. Alkali (13), bei denen eine Fraktion A auf Grund von Elektropherogrammen und Infrarotanalysen als Keratosulfat, Fraktion B als Hyaluronsäure ähnliches Material,

Fraktion C als Chondroitinsulfat bezeichnet wurde. Diese Arbeiten brachten somit grundlegende Erkenntnisse über das Vorkommen von sauren Mucopolysacchariden als Inhaltsstoffe der Grundsubstanz.

Anhaltspunkte über die Art der Altersveränderung der Mucopolysaccharide wurden durch Aminozuckeranalysen (14) erhalten. Hierbei zeigt sich, daß der Gesamthexosamingehalt innerhalb von 8 Dezennien von 14.7 % auf 6.6 % abfällt, wobei der Abfall des Galaktosamins von 9.9 % auf 2.9% stärker beteiligt ist als das Absinken des Glucosamingehaltes von 4.8 % auf 3.8 %. Unter Zugrundelegung der Annahme, daß der Glucosamingehalt dem Keratosulfat, der Galaktosamingehalt dagegen dem Chondroitinsulfat entspricht, wurde gefolgert, daß sich das Keratosulfat-Chondroitinsulfat-Verhältnis mit zunehmendem Alter von 0.5 auf 1.5 verschiebt. Nach dem Ergebnis von Schwefelanalysen, die für verschiedene Altersklassen von Zwischenwirbelscheibengewebe vorgenommen wurden (15), sollte jedoch der Anteil an Polysaccharidestersulfat während der ersten Lebensdezennien konstant bleiben und im Alter eine nur leichte Abnahme erfahren. Bei dieser Berechnung wurde der Cystin-Cystein-Schwefelgehalt des Kollagens mit 0.02 % angenommen und vernachlässigt.

Eine Studie über die Pathologie menschlicher Zwischenwirbelscheiben befaßt sich mit den chemischen Veränderungen beim Bandscheibenprolaps (16). Es zeigte sich, daß in prolabierten Bandscheiben der Gesamtmucopolysaccharidgehalt von 30 auf 5 % herabgesetzt war, diese Abnahme jedoch vorwiegend auf Kosten des Chondroitinsulfat-Anteils erfolgte. Ferner wurde eine kleine Menge des sonst nicht in Bandscheiben vorkommenden Chondroitinsulfates B gefunden. Der Kollagengehalt war gegenüber normalen Bandscheiben mit 60 % verdoppelt.

Neben altersbedingten Veränderungen der Mucopolysaccharide wurden Lipoide, Mineralien und N-Gehalt untersucht (17). Die Beurteilung der hierbei erhaltenen Werte wird jedoch durch die

kontinuierliche Abnahme des Wassergehaltes mit fortschreitendem Alter erschwert. Daher wurde eine altersabhängige Zunahme des Cholesterins und des N als möglicherweise durch die Wasserverarmung bedingt gedeutet. Ebenso wurde eine (vermutlich nur relative) Zunahme des Calciumgehaltes mit dem altersbedingten Wasserverlust in Zusammenhang gebracht.

Eine kritische Sichtung der bisherigen Ergebnisse zur Chemie des Bindegewebes ergibt, daß außer dem gesicherten Nachweis von Chondroitinsulfat und Keratosulfat und ihrer quantitativen Bestimmung beim erwachsenen gesunden Menschen (und für den Spezialfall des Bandscheibenprolaps) nur indirekte Informationen über die chemische Zusammensetzung der Zwischenwirbelscheiben in verschiedenen Altersklassen vorliegen. Angaben über den Aminozuckergehalt sind im Hinblick auf die Existenz der heute bekannten 8 verschiedenen sauren Mucopolysaccharide, von denen 4 Glucosamin und 4 Galaktosamin enthalten, wenig aufschlußreich und geben ein vieldeutiges Bild. Angaben über den Kollagengehalt im Verlauf der Altersvorgänge fehlen überhaupt.

Es erschien daher notwendig, die Altersveränderungen des Mucopolysaccharid- und Kollagengehaltes einer systematischen Untersuchung zu unterziehen. Da wirklich beweisende Angaben gemacht werden sollten, war für die verschiedenen Altersklassen neben der quantitativen Bestimmung des Kollagens in jedem Falle eine Isolierung, Trennung und chemische Identifizierung der sauren Mucopolysaccharide zu fordern.

Material und Methodik

A. Untersuchungsgut

Die für die Untersuchung verwendeten menschlichen Zwischenwirbelscheiben entstammten dem Sektionsgut des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen, wobei Proben nach Altersklassen gesammelt wurden. Um Veränderungen während der Wachstumsperiode zu erfassen, wurde das Untersuchungsgut der ersten beiden Dezen-

nien in drei Altersgruppen - Neugeborene, 1 - 4 Jahre und 10 - 20 Jahre - unterteilt. Drei weitere Gruppen umfaßten die Altersklassen von 21 - 40, 41 - 60 und 61 - 80 Jahren. Nach präparativer Isolierung wurden die Bandscheiben zunächst in Aceton gelegt und durch mehrmaligen Wechsel des Acetons in das lipidfreie Trockengewebe überführt, das zuerst an Luft und anschließend im Exsiccator getrocknet und dann der nachstehenden Aufarbeitung unterzogen wurde.

B. Analysen

Bestimmung der Gesamthexosamine nach Hydrolyse von 50 mg Acetontrockengewebe bzw. 5 mg Polysaccharidreinsubstanz mit 5 n HCl in luftdicht abgeschlossenen Hydrolysekölbchen bei 100 - 100° C für eine Dauer von 4 Stunden. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte durch die Elson-Morgan-Reaktion in einer von BOAS (18) angegebenen Modifikation. Die getrennte Bestimmung von Glucosamin und Galaktosamin wurde nach (19), die Uronsäureanalysen nach (20) durchgeführt.

Die Bestimmung der Neutralzucker (21), der L-Fucose (22), der Neuraminsäure (23), des Stickstoffs (24) und Schwefels (25) erfolgte nach angegebenen Verfahren.

Zur Kollagenbestimmung wurden Proben von je 100 mg in kleinen, mit Kapillaren verschlossenen Zentrifugenröhrchen dreimal mit 5 ml Dest.W. im Autoklaven bei 6 Atü und 164° C für drei Stunden einer Druckerhitzung unterworfen. Die jedesmal abzentrifugierten Extrakte werden vereinigt und in vorgewogenen Spitzkolben bei 110° C im Trockenschrank zum Eintrocknen gebracht, gewogen und anschließend mit 0.3 ml 6 n HCl für 24 Stunden bei 110° C hydrolysiert. Die Hydrolysate werden dann ohne weitere Vorbehandlung im Meßkolben auf 200 ml H_2O aufgefüllt und dabei verdünnt, filtriert, und von der Verdünnung je 1 ml zur Hydroxyprolinbestimmung verwandt. Diese erfolgte in Anlehnung an das von NEUMANN und LOGAN (26) angegebene Verfahren in folgender Weise: Zu 1 ml des verdünnten Hydrolysates werden nacheinander je 1 ml $CuSO_4$ und 2 ml einer 5 prozentigen Lösung von Paradimethylaminobenzaldehyd in n-Propanol dazugegeben. Es wird dann

in einem Wasserbad von 70° C 16 Minuten lang erhitzt, in Kaltwasser gekühlt und bei einer Wellenlänge von 540 mμ fotometriert. Für die Eichwerte von Hydroxyprolin wurden Konzentrationen von 5 - 10 γ/ml verwendet. Die bei der Kollagenbestimmung erhaltenen Rückstände werden mit 0.1 n Natronlauge 30 Minuten lang bei 80° extrahiert, mit dest.W. neutral gewaschen und dann im Exsiccator getrocknet und gewogen. Der so erhaltene Wert entspricht dem durch die Autoclavextraktion nicht erfaßten "unlöslichen Kollagen".

Zur Ca- Mg- Bestimmung werden 300 mg Trockensubstanz im vorgeglühten Porzellantigel für eine Dauer von 2 Stunden verascht; dann wird der weiße Veraschungsrückstand gewogen, in 3 ml conc. HCl gelöst und fast bis zur Trockene eingedampft. Mit wenig dest.W. werden die nun als Chloride vorliegenden Salze in 10-ml-Zentrifugengläser überführt, mit NaOH gegen Methylrot neutralisiert und mit 3 ml 1 prozentiger Na-Oxalat-Lösung versetzt. Die über Nacht im Eisschrank gelassene Fällung enthielt das Ca als Ca-Oxalat. Diese wird abzentrifugiert und der das gesamte Mg enthaltende Überstand auf 10 ml aufgefüllt; die das Ca-Oxalat enthaltene Fällung wird in 2 ml einer 1 n HCl gelöst und mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt. Die Titration des Ca und Mg erfolgt mit 0.01 m Komplexonlösung nach (27).

C. Isolierung und präparative Darstellung der Mucopolysaccharide

1. Gesamtmucopolysaccharide, saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide.

20 g Trockenmaterial werden in 200 ml eines Enzym-Puffer-Gemisches (0.1 m Natriumacetat, 0.005 m Cysteinhydrochlorid, 0.005 m Komplexon und 5 % Papain) gegeben und 24 Stunden bei 65° inkubiert. Danach wird das Gelöste abgegossen und der Rückstand nochmals für 24 Stunden mit frischer Enzym-Puffer-Lösung verdaut. Der unlösliche Rückstand wird mit Aceton, Alkohol und Äther gewaschen. Die vereinigten Überstände werden 24 Stunden zuerst gegen fließendes Wasser, dann gegen dest. Wasser dialysiert. Danach werden die Mucopolysaccharide durch fünffaches Vol. Äthanol unter Zugabe von 2.5 % K-Acetat gefällt. Es folgen drei weitere Fällungen bei einem pH von 3.9 und 7, mit je-

weils fünffachem Vol. Alkohol und 0.5 % K-Acetat. Nach der letzten Fällung wird das Präcipitat in dest. Wasser gelöst, je 24 Stunden in Leitungswasser und in Aqua dest. dialysiert, im Rotationsverdampfer eingeengt, gefriergetrocknet und gewogen. Das Gefriertrockenpulver enthält im Gemisch die gesamten sauren Mucopolysaccharide sowie Glykoproteide. Zur Abtrennung der Glykoproteide und zur Entfernung noch vorhandener unspezifischer Begleitproteine werden die Gesamtmucopolysaccharide einer achtstündigen Extraktion mit 90 prozentiger Phenol-Lösung unter gleichzeitiger Homogenisierung in der Schüttelmaschine mit Hilfe von Glasperlen unterworfen. Der nicht in Phenol lösliche Anteil wird abzentrifugiert, fünfmal mit Phenol gewaschen, in Wasser gelöst, zentrifugiert und der Überstand mit 2.5fachem Vol. Alkohol und 1 % Kaliumacetat gefällt. Das Präcipitat wird erneut in Wasser gelöst, dialysiert, gefriergetrocknet und gewogen. Das Wasserunlösliche wird in Aceton gewaschen, getrocknet und als "unlösliche Rückstände der sauren Mucopolysaccharide" bezeichnet.

Der Phenolextrakt und die Phenolwaschflüssigkeit werden vereinigt, sie enthalten die neutralen Mucopolysaccharide als Glykoproteide. Nach Fällung mit 5 Vol. Alkohol und 0.5 % K-Acetat wird das Präcipitat in Äthanol und Äther bis zur Phenolfreiheit gewaschen und getrocknet. Die so erhaltenen neutralen Mucopolysaccharide werden nochmals in Wasser gelöst, zentrifugiert, der Überstand dialysiert, lyophilisiert und gewogen, der wasserunlösliche Rückstand mit Aceton gewaschen und als "unlöslicher Rückstand der neutralen Mucopolysaccharide" bezeichnet.

2. Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide durch Säulenchromatographie (28)

a) analytischer Maßstab

Zellulosepulver in wässriger Aufschwemmung wird in eine Chromatographiesäule (20 x 1 ccm) unter Druck bis zur 15 ml-Marke eingeschlämmt, 10 Min. mit Dest.W., 30 Min. mit 0.1 % Cetylpyridiniumchlorid (CPC), 15 Min. mit 1 % CPC bei 10 - 20 Torr gewaschen und 1 Stunde mit 1 % CPC ohne Druck äquilibriert. Vor dem Auftragen des zu trennenden Mucopolysaccharidgemisches wird der

oberste Säulenabschnitt durch 1.5 ml Dest. W. von CPC befreit. Es werden ca 5 - 7 mg Substanz aufgegeben und zunächst mit 1 % CPC eluiert. Da die Mucopolysaccharide bis auf das Keratosulfat mit CPC wasserunlösliche Komplexe bilden, die sich erst in Gegenwart von Elektrolyten wieder lösen, werden mit der 1. Fraktion mit 1 % CPC nur Keratofulfat bzw. mit CPC nicht fällbare Proteinanteile eluiert. Mit steigenden Konzentrationen von $MgCl_2$ (0.1 n, 0.25 n, 0.5 n, 1.5 n und 2.0) wird die Fraktionierung fortgesetzt, wobei die eluierende Flüssigkeitsmenge jeweils das doppelte Volumen der Zellulosesäule umfassen muß. Im Fraktionssammler werden Einzelfraktionen von ca.1.5 cm^3 aufgefangen. Nach genauer Volumenbestimmung werden 1 cm^3 für die Orcin- bzw. Carbazolreaktionen entnommen. Bei exaktem Arbeiten sind die einzelnen Peaks der verschiedenen Fraktionen scharf voneinander getrennt und auf wenige Reagenzgläser beschränkt. Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Mucopolysaccharide werden Testsubstanzen in bekannter Konzentration unter gleichen Bedingungen behandelt, so daß Ungenauigkeiten durch verschiedene Handhabung von Testsubstanz und zu bestimmendem Mucopolysaccharid ausgeschlossen werden. Während man mit der Orcinreaktion Neutralzucker (Galaktose, Mannose und Fucose, auch Glucoronsäure) erfaßt, reagieren dagegen Hexosamine nicht. Bei den sauren Mucopolysacchariden ist diese Reaktion nur für das uronsäurefreie Keratosulfat bestimmend und entspricht bei reinen Präparaten dem Gehalt an Galaktose. Die Carbazolreaktion ist spezifisch für Uronsäuren.

b) Präparativer Maßstab

Zur präparativen Darstellung der sauren Mucopolysaccharide wird das Säulenvolumen auf 450 ml vergrößert, mit einem Flüssigkeitsvolumen von jeweils 900 ml eluiert und im Fraktionssammler in 20 ml Portionen aufgefangen. Die Position der Reaks wird durch die Orcin- und Carbazolreaktion ermittelt. Die den verschiedenen sauren Mucopolysacchariden entsprechenden Einzelfraktionen werden vereinigt und mit dem 3 - 4 fachen Vol. Äthanol gefällt. Die Fällungen werden mit Alkohol und Äther gewaschen, zweimal 24 Stunden dialysiert und gefriergetrocknet.

Ein technisch anderes aber prinzipiell analoges Trennverfahren wird durch Waschen und Zentrifugieren in CPC-gesättigter Zelluloseaufschwemmung durchgeführt. Es hat den Vorteil, daß noch größere Mengen des zu trennenden Gemisches eingesetzt werden können. 5 g der Gesamtmucopolysaccharide werden in 100 ml gelöst und unter Rühren 200 ml einer Cellulosesuspension von 2.5 % CPC zugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wird zentrifugiert. Der Überstand enthält nur Keratosulfat, während die übrigen Mucopolysaccharide als unlösliche CPC-Mucopolysaccharid-Komplexe zusammen mit der Zellulose im Niederschlag vorhanden sind. Die fraktionierte Elution der übrigen sauren Mucopolysaccharide erfolgt durch dreimaliges Waschen mit jeder der analog zur Säulenchomatographie verwendeten $MgCl_2$-Lösungen in steigender Konzentration. Die durch Zentrifugieren erhaltenen Überstände werden für jede Elektrolytkonzentration getrennt vereinigt und daran die Mucopolysaccharide wie oben beschrieben isoliert.

Zur weiteren Reinigung werden die sauren Mucopolysaccharide einer Entproteinisierung mit Chloroform-Amylalkohol unterzogen (29). Dazu wird ein Teil einer 2 prozentigen Mucopolysaccharidlösung zu 5 Teilen Chloroform/Amylalkohol im Verhältnis 3.3 : 1.7 und einem Teil Na-Acetat in Eisessig gegeben, 10 Minuten intensiv geschüttelt und 30 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase hebt man ab, fällt, dialysiert und befreit sie am Austauscher von Salzen und durch einstündiges Ultrazentrifugieren (30 000) von ihren dispersen Bestandteilen. Das gefriergetrocknete Ultrazentrifugat kann nun analysiert werden.

Das aus Zwischenwirbelscheiben isolierte Keratosulfat (s."Ergebnisse") wird zusätzlich in folgender Weise gereinigt: Die Trockensubstanz gibt man zu einem Phosphatpuffer von pH 7.2 und inkubiert sie 48 Stunden in einer Hyaluronidaselösung von 450 E Kinetin und 48 Stunden in eine Fermentlösung von 3 mg Trypsin bei 37° C. Dieser Ansatz wird mit Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt, um größere Eiweißbestandteile auszufällen. Nach Neutralisation erfolgt Dialyse, Ultrazentrifugierung und Überführung der Substanz in

die freie Säureform an der Austauschersäule mit Dowex 50 (H^+-Form) mit anschließender Gefriertrocknung.

Ergebnisse

1.) Bindegewebsanalysen des lipidfreien Discustrockengewebes. Altersveränderungen des Kollagen-, Hexosamin- und Mineralgehaltes

Nach morphologischen Untersuchungen bilden Kollagen- bzw. Reticulinfasern und die strukturlose Grundsubstanz die vorherrschenden Bauelemente der Zwischenwirbelscheiben. Um ein orientierendes Bild über die Altersveränderungen dieser beiden Komponenten zu erhalten, wurden quantitative Bestimmungen des Gehaltes an Hydroxyprolin und Analysen des Hexosamingehaltes durchgeführt. Diese beiden Bestimmungsgrößen wurden gewählt, da einmal das Hydroxyprolin mit 12 - 13 % eine für das Kollagen charakteristische Bestimmungsgröße ist und dessen Menge Aussagen über den Kollagengehalt einer Gewebsprobe gestattet. Die quantitative Bestimmung der beiden Aminozucker Glucosamin und Galaktosamin gibt dagegen Anhaltspunkt über den Gehalt an hexosaminhaltigen Polysacchariden.

Um individuelle Schwankungen der Analysenwerte bei den einzelnen Gewebsproben auszuschalten und ein möglichst einheitliches Ausgangsmaterial für die analytischen und präparativen Arbeiten zu gewinnen, wurde das Untersuchungsgut in 6 Altersgruppen vereinigt und innerhalb dieser Gruppe repräsentative Proben zur Analyse entnommen. Die aus Tabelle 1 ersichtlichen Daten geben daher Durchschnittswerte wieder, die für die verschiedenen Altersgruppen gewonnen wurden.

Bei den Angaben für den Kollagengehalt wurde eine Aufschlüsselung für lösliches und unlösliches Kollagen vorgenommen, entsprechend dem Löslichkeitsverhalten bei Druckerhitzung im Autoclaven. Das lösliche Kollagen, das in allen Altersklassen mit Werten zwischen 69.5 % (61 - 80 J.) und 96 % (1 - 4 J.) die Hauptmasse des Gesamtkollagens ausmacht, erreicht von einem

Tab. 1: Kollagen-, Hexosamin-, Calcium- und Magnesium-Gehalt menschlicher Zwischenwirbelscheiben in verschiedenen Lebensaltern.
Angaben in % des Acetontrockengewebes.

Altersklasse	Kollagen		Hexosamin (total)	Ca	Mg	Veraschungsrückstand
	Lösliche Fraktion	unlösliche Fraktion				
Neugeborene	38,7	4,9	6,20	2,16	0,56	6,73
1 - 4 J.	45,0	1,8	7,25	1,34	0,39	6,75
10 - 20 J.	50,0	0,9	5,75	1,73	-	5,80
21 - 40 J.	44,5	1,4	6,25	0,69	0,34	4,29
41 - 60 J.	42,2	2,2	5,50	0,76	0,32	4,78
61 - 80 J.	41,1	5,8	5,25	1,36	0,27	5,26

Tiefstwert beim Neugeborenen ausgehend mit 50 % des Trockengewichtes ein Maximum zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr, um dann mit fortschreitendem Lebensalter kontinuierlich wieder abzufallen. Eine gegenläufige Bewegung ist vom zweiten Dezennium ab für das nichtlösliche Kollagen feststellbar, das bis zum 80. Lebensjahr eine altersabhängige Zunahme erfährt. Bei Addition beider Kollagenwerte bleibt ein Anstieg von der Geburt bis zum Abschluß des Körperwachstums (43.6 - 50.9 %) deutlich, doch ist der nachfolgende für das lösliche Kollagen beobachtete Abfall wegen der gleichzeitigen Zunahme des unlöslichen Kollagens weniger ausgeprägt.

Eindeutige Altersveränderungen ergaben auch die Werte der Gesamthexosaminbestimmung. Hier zeigt sich, daß die Summe der Aminozuckerpolysaccharide in den ersten Jahren nach der Geburt ansteigt und die zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr gefundenen Maximalwerte mit fortschreitendem Lebensalter auf ca 70 % dieses Wertes absinken (7.25 % - 5.25 %).

Bei der Bewertung der Mineralanalysen ist zu berücksichtigen, daß der Calciumgehalt z. T. durch mucopolysaccharidgebundenes Calcium bedingt sein, zum anderen auch als anorganisches Calcium (Tricalciumphosphat) vorliegen kann. Da der Calciumgehalt auch im nichtverknöchernden Knorpel durch Bindung an dort lokalisierte sulfatierte Mucopolysaccharide ca. 20 - 30 mal höher liegt als im Blutserum (30), wird verständlich, daß mit zunehmendem Absinken der Hexosaminwerte (wie auch des Mucopolysaccharidgehaltes, s. Abschnitt 2 und 3) auch die Calciumwerte bis zum 60. Lebensjahr eine eindeutig fallende Tendenz zeigen. Erst die zwischen dem 61- und 80. Lebensjahr progressive Deposition von anorganischem Calcium führt zu einem höheren prozentualen Ca-Gehalt des Trockengewebes. Der Magnesiumgehalt, der im ganzen um eine Zehnerpotenz niedriger liegt als der entsprechende Calciumwert, zeigt von der Geburt ab einen fortschreitenden altersabhängigen Rückgang, der im höheren Lebensalter 50 % des Ausgangswertes erreicht.

2.) Isolierung, chemische Zusammensetzung und Altersveränderung der Gesamtmucopolysaccharide

Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Bausteine der Zwischenwirbelscheiben (31) haben ergeben, daß die Polysaccharide der Grundsubstanz die Aufgabe der Wasserbindung und des elastischen Druckausgleiches zwischen den Wirbelkörpern übernehmen und deren Quantität, chemische Natur und molekularer Status hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Da die Altersveränderungen der Zwischenwirbelscheiben in erster Linie durch Verlust der physiologischen Funktionen gekennzeichnet sind, schien es notwendig, Art und Verteilung der verschiedenen Polysaccharidtypen der Zwischenwirbelscheiben eingehend zu untersuchen.

Für die Isolierung der Gesamtmucopolysaccharide sowie die Trennung in saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide wurden die bei der Untersuchung anderer mesenchymaler Gewebe eingesetzten und bewährten Methoden herangezogen. Sie bestehen im Prinzip darin, daß die im Gewebe sehr fest verankerten "strukturgebundenen" Mucopolysaccharide durch proteolytische Enzyme von Fasern und anderen Begleitproteinen befreit, durch Dialyse und Äthanolfällungen weiter gereinigt, und schließlich durch Behandlung mit 95 prozentigem flüssigen Phenol von den Glykoproteiden getrennt werden. Das Ergebnis dieses Aufarbeitungsganges, der für sechs verschiedene Altersgruppen unter streng identischen Bedingungen durchgeführt wurde, ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Eine Auswertung der Abbildung 1 und Tab. 2 bestätigt zunächst die in Abschnitt 1 bezüglich der Abnahme des Hexosamingehaltes gemachte Feststellung insofern, als sich bei der quantitativen präparativen Darstellung der Gesamtmucopolysaccharide völlig analoge Verhältnisse ergeben: Einem Gipfel im ersten Lebensjahr folgt eine kontinuierliche Abnahme des Mucopolysaccharidgehalts. Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis besteht darin, daß die Glykoproteide gegenüber den sauren Mucopolysacchariden in einer vernachlässigbar kleinen Quantität im Bandscheibengewebe enthalten sind und nur 5 bis maximal 15 % der Gesamt-

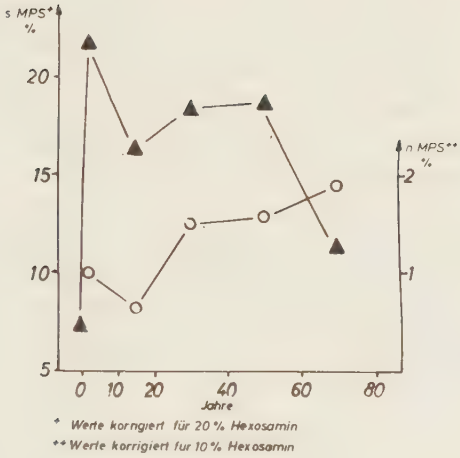

Abb. 1. Gehalt an sauren Mucopolysacchariden und Glykoproteiden in menschlichen Zwischenwirbelscheiben in verschiedenen Lebensaltern. Angaben in % des Acetontrockengewebes. Die Hexosaminwerte sind für saure Mucopolysaccharide auf 20 %, für die Glykoproteide auf 10 % korrigiert.

mucopolysaccharide ausmachen und daß ferner saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide im Altersgang eine gegenläufige Bewegung zeigen. Während die Alterskonzentrationskurve bei den sauren mucopolysacchariden das gleiche Profil wie bei den Gesamtmucopolysacchariden (bzw. wie beim Hexosamingehalt) aufweist, läßt der Gehalt an Glykoproteiden eine Zunahme erkennen, die vom 21. - 80. Lebensjahr in einer Verdreifachung des prozentualen Gehaltes besteht. Dabei ist jedoch zu beachten, daß der geringe Absolutgehalt die Bewertung dieser Altersveränderung erschwert.

Tabelle 2 gibt eine Bilanz der bei der präparativen Aufarbeitung erhaltenen Ausbeuten sowie einen Einblick in den Reinheitsgrad der sauren Mucopolysaccharide wieder. Der zwischen 15,0 und 23,4 liegende Prozentgehalt für die sauren Mucopolysaccharide läßt auf eine 3 -5fach Anreicherung gegenüber dem Ausgangsmaterial schließen, doch wurde im Hinblick auf die Tatsache, daß es sich hier noch um ein Gemisch verschiedener Typen von sauren Mucopolysacchariden handelt, eine weitere Reinigung nicht vorgenommen, sondern die (im nächsten Abschnitt beschriebene) Fraktionierung und Reindarstellung der einzelnen Mucopolysaccharidtypen angeschlossen.

Unter der Rubrik unlöslicher Rückstand ist das bei der Aufarbeitung nach der Phenolextraktion nicht mehr lösliche Material erfaßt. Der geringe Hexosamingehalt dieser Fraktion, der um Werte von 1 % schwankt, sowie der hohe Stickstoffgehalt deuten auf denaturierte Proteine hin.

3.) Isolierung und chemische Identifizierung der sauren Mucopolysaccharide

Nach den vorliegenden Erfahrungen enthalten mesenchymale Gewebe meist mehrere Typen saurer Mucopolysaccharide, die jedoch bei der Isolierung auf Grund ihrer ähnlichen chemischen Eigenschaften zunächst als Gemisch anfallen, und als saure Gesamtmucopolysaccharide bezeichnet werden (s.Tabelle 2, Abschnitt 2)

Die Trennung eines Gemisches saurer Mucopolysaccharide ist nach verschiedenen Verfahren (Elektrophorese, Papierchromatographie, fraktionierte Äthanolfällung der Calciumsalze, Fraktionierung der Cetylpyridiniumkomplexe und Austauschchromatographie) möglich. Für die vorliegende Fragestellung fiel die Wahl auf das Cetylpyridiniumchloridverfahren (siehe Methodik), das nach dem Prinzip arbeitet, daß die wasserunlöslichen Cetylpyridiniumkomplexe der sauren Mucopolysaccharide durch successive Elektrolytzugabe in wässriger Lösung resolubilisiert und damit getrennt werden können und das zudem den Vorteil bietet, daß es auch im präparativen Maßstab angewendet werden kann. Da das im Mucopolysaccharidgemisch der Zwischenwirbelscheiben ver-

Tab. 2. Prozentualer Anteil der sauren Mucopolysaccharide und Glykoproteide, bezogen auf das Acetontrockengewebe. Die Hexosaminwerte für saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide geben den Gehalt der isolierten Substanz an.

Altersklasse	Gesamt-MPS in % des T.G.	saure MPS in % des T.G.	Hexosamin-gehalt	unlösliche Rückstände in % des T.G.	neutrale MPS in % des T.G.	Hexosamin-gehalt	unlösliche Rückstände in % des T.G.
Neugeborene	18,50	10,37	15,0	0,08	-	-	-
1 - 4 J.	28,50	20,47	21,7	0,23	1,10	9,2	0,14
10 - 20 J.	22,70	18,75	18,1	0,14	0,51	12,8	0,22
21 - 40 J.	23,45	16,80	22,5	0,15	1,05	14,2	1,04
41 - 60 J.	21,30	16,37	23,4	0,51	1,38	11,4	0,24
61 - 80 J.	17,65	12,15	19,3	0,34	1,85	9,8	0,61

mutete Keratosulfat (12) im Gegensatz zu den anderen sauren Mucopolysacchariden im Überschuß von Cetylpyridinium wasserlöslich bleibt, erschienen die Voraussetzungen für dessen Abtrennung und Gewinnung besonders günstig.

Abbildung 2 gibt in graphischer Darstellung das Elutionsdiagramm für die sauren Mucopolysaccharide am Beispiel der Altersklasse 61 - 80 Jahre wieder. Da die Flächenintegrale der einzelnen Gipfel der Konzentration der getrennten Einzelkomponenten entsprechen, läßt sich aus dem Diagramm nicht nur die Zahl der im Mucopolysaccharidgemisch vorhandenen Komponenten, sondern auch deren prozentualer Anteil ermitteln. Das Resultat dieses orientierenden Vorversuches, der systematisch und mehrfach für alle Altersklassen durchgeführt wurde und in Abschnitt 4 beschrieben wird, führt zu der Feststellung, daß im Zwischenwirbelscheibengewebe mit der Existenz von drei verschiedenen sauren Mucopolysacchariden zu rechnen ist, von denen jedoch zwei (Fraktion I und V) den überwiegenden Anteil ausmachen und eine dritte Komponente (Fraktion III) nur in sehr geringer Menge vorhanden ist.

Die scharfe Trennung der drei Mucopolysaccharidkomponenten nach der vorliegenden Methode ließ deren Anwendung auch im präparativen Maßstab als aussichtsreich erscheinen. Sie wurde für alle Altersklassen, bei denen genügend Substanzmengen für eine Fraktionierung zur Verfügung standen, nach der im Versuchsteil näher beschriebenen Methode durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Aus den Zahlenangaben der Tabelle 3 geht zunächst hervor, daß das gewählte Trennverfahren in allen Altersklassen saure Mucopolysaccharide von hohem Reinheitsgrad liefert. Weiterhin gestattet das Ergebnis Aussagen über die chemische Natur der isolierten Mucopolysaccharide. Die Tatsache, daß das in allen Ansätzen mit 1 % Cetylpyridiniumlösung eluierte schwefelhaltige Mucopolysaccharid der Fraktion I trotz hoher Hexosaminwerte eine positive Carbazolreaktion vermissen läßt, dagegen durch die Orcinreaktion ein hoher Neutralzuckergehalt angezeigt wird,

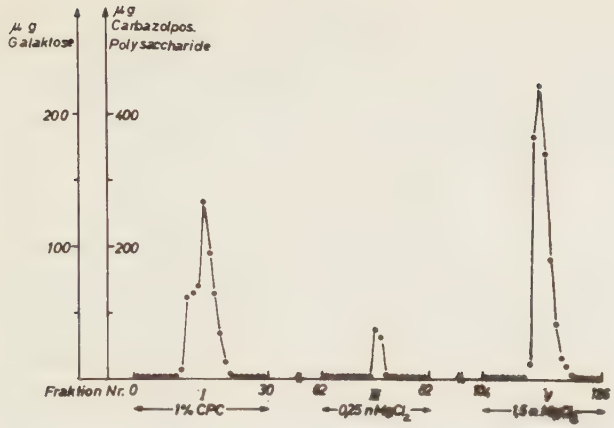

Abb.2: Säulenchromatographische Fraktionierung von sauren Gesamtmucopolysacchariden (7 mg) menschlicher Zwischenwirbelscheiben als CPC-Komplexe nach (28). Altersklasse 61-80, Säulenvolumen 15 ml. Elution mit 1 % CPC-Lösung (Fraktion I) und 0.1 n (Fraktion II), 0.25 n (Fraktion III), 0.5 n (Fraktion IV), 1.5 n (Fraktion V) und 2.0 n (Fraktion VI) wässriger Magnesiumchloridlösung. Als Bezugssubstanz für die quantitative Auswertung wurde Galaktose (Orcinreaktion, Fraktion I) und Chondroitinsulfat A (Carbazolreaktion, Fraktion V) bzw. Hyaluronat (Fraktion III) verwendet.

ist als Hinweis für die Identität dieser Fraktion mit Keratosulfat zu werten. In Fraktion V legen die regelmäßig in äquimolarem Verhältnis gefundenen Werte für Hexosamin und Uronsäure und der zwischen 4.4 und 5.1 % liegende Schwefelgehalt die Vermutung nahe, daß es sich um Chondroitinsulfat handelt. Beweise für diese Vermutungen s. u.

Auffallend sind auch die quantitativen Relationen der Fraktionen I und V in Beziehung zum Lebensalter. Während in den ersten Lebensjahren fast ausschließlich Chondroitinsulfat (Fraktion V) als saures Mucopolysaccharid gefunden wird, nimmt dessen Gehalt in den höheren Altersklassen ständig ab und wird in zunehmendem Maße durch Keratosulfat (Fraktion I) ersetzt, so daß sich im höheren Lebensalter etwa gleiche Mengen an Keratosulfat und Chondroitinsulfat finden. Diese Verhältnisse sind in Abschnitt 4 näher untersucht.

Tab. 3. Prozentualer Gehalt und chemische Zusammensetzung der bei der Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide in verschiedenen Altersklassen erhaltenen Hauptkomponenten (Fraktion I und V). Die Werte für die Fraktion III sind nicht mit aufgeführt. Weitere Einzelheiten im Text.

	Fraktion I					Fraktion V				
Altersklasse	% saure Gesamt-MPS	Hexosamin (total)	Galactose (Orcin)	N	S	% saure Gesamt-MPS	Hexosamin (total)	Uronsäure (Carbazol)	N	S
1 - 4 J.	13,2	22,5	26,4	2,96	2,45	72,2	28,5	26,5	2,33	4,60
10 - 20 J.	17,7	22,5	27,2	2,99	2,33	59,5	28,0	25,8	2,36	5,10
21 - 40 J.	19,2	23,0	26,6	3,01	2,45	52,0	24,0	23,2	2,43	4,40
61 - 80 J.	30,2	23,0	26,0	3,08	2,45	35,5	25,0	23,6	2,54	4,57

Nicht in der Tabelle 3 aufgeführt sind Angaben für die Fraktion III, deren prozentualer Anteil 2.8 - 3.8 % der Gesamtmucopolysaccharide betrug. Die geringen Substanzmengen wurden für die weitere Reinigung und chemische Charakterisierung benötigt, so daß Analysenwerte in Tabelle 3 ausgelassen wurden.

Als Kriterien für die Identität eines unbekannten sauren Mucopolysaccharids mit einem der bekannten Typen gelten neben der chemischen Analyse die Ergebnisse physikalisch-chemischer Messungen sowie die Angreifbarkeit durch Hyaluronatlyase. Nach mehrfachen Reinigungsschritten und z.T. unter Einsatz weiterer Reinigungsverfahren konnte unter Berücksichtigung der genannten Anforderungen der Beweis erbracht werden, das Keratosulfat und Chondroitinsulfat die Hauptmucopolysaccharide menschlicher Zwischenwirbelscheiben sind, und daß weiterhin das Vorhandensein von Hyaluronsäure - wenn auch in geringer Konzentration - mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist. Tabelle 4 gibt die experimentellen Belege. Alle für Fraktion I gefundenen Werte entsprechen einem hochgereinigten Keratosulfat. Dies geht aus dem nahezu ausschließlich als Glucosamin vorliegenden Aminozuckergehalt, dem Fehlen von Uronsäure, dem hohen Schwefelgehalt ebenso hervor, wie aus dem Drehwert von -7^{o}, der für Keratosulfat auch von anderen Untersuchern als um 0^{o} schwankend angegeben wird. Ebenso ist die Nichtangreifbarkeit durch Testeshyaluronidase ein bezeichnendes Merkmal des Keratosulfats.

Daß es sich bei Fraktion V um Chondroitinsulfat handelt, ergibt sich neben den der Theorie entsprechenden chemischen Analysenwerten +) auch aus dem IR-Spektrum. Die im IR-Bereich gemessenen Absorptionsbanden erlauben weiterhin die Aussage, daß hier fast ausschließlich Chondroitinsulfat vorliegt. Eine dem Chondroitinsulfat A entsprechende Bande bei 850 cm^{-1} war andeu-

---

+) für das Kaliumsalz von Chondroitinsulfat A bzw. C ($K_2C_{14}H_{19}NO_{14}S \cdot 4\ H_2O$) errechnen sich folgende Werte:

Galaktosamin = 29.4, Glucuronsäure = 31.9, N = 2.3, S = 5.3

Tab. 4. Chemische Zusammensetzung und physiko-chemisches Verhalten säulenchromatographisch isolierter Einzelfraktionen saurer Mucopolysaccharide aus menschlichen Zwischenwirbelscheiben. Fraktion I entspricht Keratosulfat, Fraktion V dem Chondroitinsulfat C.

	Fraktion I (Keratosulfat)	Fraktion III (Hyaluronsäure)	Fraktion V (Chondroitonsulf [A] + C)
Glucosamin	28,6	17,5	-
Galaktose	0,5	7,5	28,0
Uronsäure (Carbazol)	<0,05	28,8	30,8
Neutralzucker	28,2	-	-
N	3,25	3,48	2,39
S	5,18	1,30	5,16
$[\alpha]_D^{20}$	-7°	$-42{,}5^{\circ}$	-13°
JR -Banden	815 cm^{-1} 1000 cm^{-1}	*)	815 cm^{-1} 990 cm^{-1}
Angreifbarkeit durch Testes-hyaluronat-Lyase	-	+	+

*) siehe Text

tungsweise (Schulter) vorhanden. Dies erklärt auch den Drehwert von -13° und die Angreifbarkeit durch Hyaluronatlyase. Untersuchungen über die Mengenkorrelation Chondroitinsulfat A und C in Abhängigkeit vom Lebensalter s.u.

Nach Ausweis der Glucosamin-Galaktosamindifferenzierung enthält Fraktion III 70 % eines glucosaminhaltigen, schwefelarmen Mucopolysaccharids. Da Hexosamin und Uronsäure in einem molaren Verhältnis von 1: 1 vorliegen, der optische Drehwert praktisch der Hyaluronsäure entspricht, und auch Empfindlichkeit gegen Testeshyaluronidase vorliegt, darf mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß auch die Hyaluronsäure zu den essentiellen Mucopolysacchariden der menschlichen Zwischenwirbelscheiben gehört. Ihr Anteil an den Gesamtmucopolysacchariden beträgt jedoch weniger als 5 % (s.Abschnitt 4).

4.) Veränderungen des Spektrums der sauren Mucopolysaccharide in Abhängigkeit vom Lebensalter

Charakteristische Altersveränderungen in der Verteilung saurer Mucopolysaccharide wurden für menschlichen Rippenknorpel beschrieben (32). Eine Übertragung dieser Befunde auf die Zwischenwirbelscheibe ist aber schon deshalb nicht möglich, da einmal der Rippenknorpel ein hyaliner Knorpel, der Discus intervertebralis dagegen ein Faserknorpel ist. Zum anderen sind die Zwischenwirbelscheiben gänzlich anderen funktionellen Aufgaben und Belastungen unterworfen, die den Ablauf chemisch meßbarer Altersveränderungen u. U. modifizieren können. Für das Vorliegen charakteristischer Altersveränderungen auch im Zwischenwirbelgewebe sprechen neben den eingangs zitierten Aminozuckeranalysen (14) vor allem die in Abschnitt 3 aufgeführten Werte der Tabelle 3. Für eine systematische Überprüfung dieser Frage bilden die Möglichkeit einer quantitativ-analytischen säulenchromatographischen Trennung und die bereits erfolgte Identifizierung der Hauptmucopolysaccharide als Keratosulfat und Chondroitinsulfat eine gute experimentelle Basis. Die sauren Gesamtmucopolysaccharide aller Altersklassen wurden daher in analytischem Maßstab einer säulenchromatographischen

Fraktionierung unterworfen, von der bereits in Abbildung 2 ein Beispiel wiedergegeben wurde. Für alle Altersgruppen wurde das Mengenverhältnis der Mucopolysaccharidtypen durch kolorimetrische Reaktion in der beschriebenen Weise quantitativ ermittelt.

Aus den in Tabelle 5 niedergelegten Ergebnissen lassen sich eindeutige Veränderungen des Spektrums der sauren Mucopolysaccharide ableiten. Damit zeigt sich, daß nicht nur der Absolutgehalt der Mucopolysaccharide als Funktion des Lebensalters eine fallende Tendenz zeigt, sondern daß auch in der Verteilung der verschiedenen Mucopolysaccharide charakterisrische altersabhängige Gesetzmäßigkeiten bestehen. Sie betreffen in erster Linie den Chondroitinsulfat/Keratosulfat-Quotienten, der von einem Wert von 11.7 mit bemerkenswerter Kontinuität im hier untersuchten Abstand von je zwei Dekaden bis auf einen Wert von 0.92 absinkt. Dieser Quotient drückt aus, daß das Chondroitinsulfat, das zu Beginn des Lebens über 90 % der Gesamtmucopolysaccharide stellt, nach und nach durch Keratosulfat ersetzt wird, und daß das zu Beginn des Lebens fast fehlende Keratosulfat gegen Ende des Lebens die Hälfte der Gesamtmucopolysaccharide stellt. Abnahme des Chondroitingehaltes und Zunahme der Keratosulfatmenge zeigen bei der Veränderung ihres prozentualen Anteiles, der bei den letzten drei Altersgruppen in allen Fällen eine Differenz von 12 - 14 % ausmacht, eine geradezu auffällige gegenläufige Kongruenz.

Auch in der hyaluronsäurehaltigen Fraktion III läßt sich in einem Anstieg von 0.77 (1 - 4 Jahre) auf 4.02 (61 - 80 Jahre) ein Altersgang erkennen, der trotz des geringen quantitativen Anteils dieser Fraktion insofern auffällig ist, als er allen bisher vorliegenden Erfahrungen über das Verhalten der Hyaluronsäure als Funktion des Alters widerspricht.

Wie in Abschnitt 3 dargelegt, liegt das Chondroitinsulfat vorwiegend in Form des Isomeren C vor. Bei den ausgeprägten Gehaltsänderungen des Chondroitinsulfats im Laufe des Lebens war jedoch zu vermuten, daß das Mengenverhältnis der beiden Chondroitinsulfat-Isomeren A und C bestimmten Altersveränderungen

Tab. 5. Verteilungsmuster der sauren Mucopolysaccharide menschlicher Zwischenwirbelscheiben in verschiedenen Lebensaltern.
Die prozentualen Angaben sind auf die nach Chromatographie wiedergefundene Menge an Gesamtmucopolysacchariden bezogen.

Altersklasse	zur Trennung eingesetzt mg	Fraktion I		Fraktion III		Fraktion V		Σ Fraktion I-V
		mg	%	mg	%	mg	%	mg
Neugeborene	7,5	0,446	7,80	0,077	1,30	5,40	91,50	5,94
1 - 4 J.	6,9	0,480	12,99	0,030	0,77	3,42	87,74	3,93
10 - 20 J.	6,7	0,880	21,95	0,087	2,18	3,04	75,96	4,00
21 - 40 J.	6,8	1,120	24,08	0,102	2,21	3,42	73,71	4,64
41 - 60 J.	6,4	1,260	36,51	0,090	2,54	2,10	60,87	3,95
61 - 80 J.	7,0	1,800	49,93	0,145	4,02	1,67	46,05	3,61

unterworfen ist. Eine Entscheidung über diese Frage wurde durch eine getrennte Bestimmung von Chondroitinsulfat A und C erhalten. Unter den zur Verfügung stehenden methodischen Möglichkeiten wurde ein enzymatisches Bestimmungsverfahren herangezogen (33), das auf einer Freisetzung von "Acetylhexosamin" (Tetrasaccharideinheiten) durch Testeshyaluronidase aus Chondroitinsulfat A bzw. C beruht. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß ein C_6-substituiertes N-Acetylhexosamin die typische Farbreaktion in der Morgan-Elson-Reaktion (34) zeigt, während C_4-substituierte N-Acetylhexosamine eine nahezu vollständige Unterdrückung der Farbreaktion geben. Das bedeutet, daß unter den Bedingungen der Morgan-Elson-Reaktion nach enzymatischem Abbau durch Testeshyaluronatlyase lediglich das aus dem Chondroitinsulfat C stammende N-Acetyl-Galactosamin-6-sulfat durch Farbreaktion erfaßt wird, während N-Acetyl-Galaktosamin-4-sulfat keinerlei Reaktionstendenz zeigt. Modellversuche konnten sichern, daß in Gemischen von Chondroitinsulfat A, B und C Chondroitinsulfat C mit großer Spezifizität selektiv quantitativ bestimmt werden kann und daß auch die Anwesenheit von Keratosulfat nicht, diejenige von Chondroitinsulfat B nur geringfügig interferiert. Eine enzymatische Bestimmung des in den sauren Mucopolysacchariden der Bandscheiben enthaltenen Chondroitinsulfat C-Anteils konnte daher an den Gesamtmucopolysacchariden vorgenommen werden. Das Ergebnis, das in Tabelle 6 wiedergegeben ist, zeigt eine altersabhängige Zunahme des Chondroitinsulfat C, bezogen auf den Gehalt an Gesamtchondroitinsulfat, wobei sich der prozentuale Anteil der beiden Chondroitinsulfat-Isomeren etwa umkehrt.

Das Ergebnis dieser Inversion ist durch Zunahme des Chondroitinsulfat C-Anteiles von 34.2. auf 60.1 % mit entsprechendem Abfall des Chondroitinsulfat-A-Gehaltes gekennzeichnet. Allerdings ist die Verdoppelung des Chondroitinsulfat-C-Gehaltes nur eine scheinbare, da gleichzeitig die Beziehungsgröße (der Gehalt an Gesamtchondroitinsulfat) um 50 % abnimmt. Setzt man den Chondroitinsulfat-C-Gehalt nämlich zur Menge der Gesamtmucopolysaccharide in Korrelation (Rubrik 3 der Tabelle 6), so erweist sich der Chondroitinsulfat-C-Gehalt während des ganzen

Tab. 6. Änderungen der Chondroitinsulfat A/C Relation in Mucopolysacchariden menschlicher Zwischenwirbelscheiben in Abhängigkeit vom Lebensalter. Enzymatische Bestimmung des Chondroitinsulfat C in den Gesamtmucopolysacchariden nach (33).
Gesamtchondroitinsulfat = Summe der Chondroitinsulfat-Isomeren A und C.

Altersklasse	Gesamt-MPS		Gesamt-MPS (Σ A + C)	
	% CS-A + CS-C	% CS-C	% CS-A	% CS-C
1 - 4 J.	87,7	30,1	65,8	34,2
10 - 20 J.	75,9	33,0	63,7	36,3
21 - 40 J.	73,7	37,6	48,8	51,1
41 - 60 J.	60,8	26,4	56,3	43,7
61 - 80 J.	46,6	28,2	39,9	60,1

Lebens als praktisch konstant. Es ergibt sich mithin, daß die altersabhängige Reduktion des Chondroitinsulfatgehaltes praktisch ausschließlich auf Kosten des Chondroitinsulfats A erfolgt, während der Bestand an Chondroitinsulfat C nicht betroffen ist. Die hier gewonnenen Ergebnisse der Altersveränderungen des Bindegewebes der Zwischenwirbelscheiben sind in Abbildung 3 nochmals zusammengefaßt. Nach Ausweis des dort dargestellten Diagrammes sind die Altersveränderungen besonders für Keratosulfat und Chondroitinsulfat A und C so charakteristisch, daß sie geradezu eine biochemische Altersbestimmung an Untersuchungsproben unbekannten Lebensalters erlauben würden. Sie liefern darüberhinaus einen weiteren experimentellen Beweis dafür, daß sich beim Menschen chemische Alterswandlungen bevorzugt an mesenchymalen Strukturen erfassen und verfolgen lassen.

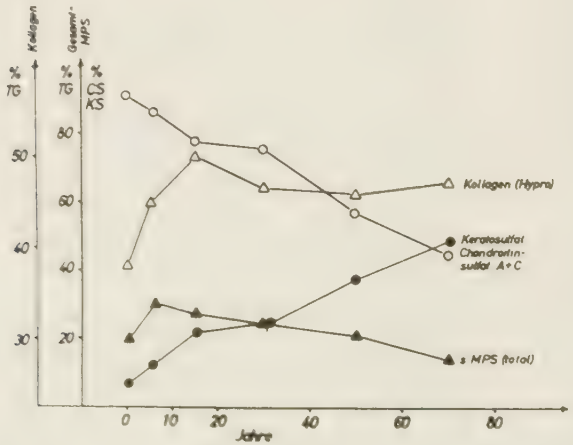

Abb. 3: Altersveränderungen menschlicher Zwischenwirbelscheiben. Angaben in Prozent des Trockengewichtes bzw. der sauren Gesamtmucopolysaccharide.

5.) Chemische Zusammensetzung der Glykoproteide

Die durch ihre Phenollöslichkeit von den sauren Mucopolysacchariden unterscheidbaren Glykoproteide weichen in ihrer chemischen Zusammensetzung von den sauren Mucopolysacchariden dadurch ab, daß sie bei der enzymatischen Proteolyse nicht als reine Polysaccharide anfallen, ihr Uronsäure- und Sulfatgehalt nur gering ist und daß neben Aminozuckern, unter denen Glucosamin überwiegt, auch Neutralzucker an ihrem Aufbau beteiligt sind. Änderungen in der chemischen Zusammensetzung in Bezug auf das Lebensalter ergaben sich nicht. Die Schwankungen des Hexosamingehaltes (9.2 - 14 %) und der Orcinreaktion (8.7 - 14.4 %) ließen keine Beziehung zum Lebensalter erkennen.

Um auszuschließen, daß die Glykoproteide, bei denen es sich sicher nicht um einen einheitlichen Typus, sondern um ein Gemisch verschiedener Spaltprodukte handelt, durch saure Mucopolysaccharide verunreinigt waren, wurde zu ihrer genaueren analytischen Charakterisierung eine nochmalige Äthanolfraktionierung vorgenommen, deren Wirksamkeit sich am Negativwerden der Carbazolreaktion in der mit 5 Vol. Äthanol gefällten Fraktion II zeigte. In der Tabelle 7 sind die Analysenergebnisse der aus den verschiedenen Altersklassen vereinigten und durch Äthanolfraktionierung weitergereinigten Glykoproteide aufgeführt. Fraktion II stellt das gereinigte Glykoproteid dar.

Die Glykoproteide der Zwischenwirbelscheiben zeigen in ihrer chemischen Zusammensetzung eine Verwandtschaft zu den Glykoproteiden des Blutplasmas sowie zu Fraktionen, die in analogen Aufarbeitungsverfahren aus anderen mesenchymalen Organen gewonnen werden. Eine Entscheidung, ob sie auch eine biogenetische Beziehung zu den Blutplasmaglykoproteiden besitzen, ob sie reelle Funktionen im Gewebe der Zwischenwirbelscheiben erfüllen oder lediglich den Interzellulärraum passierende Plasmabestandteile sind, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Tab. 7. Chemische Zusammensetzung von phenollöslichen Glykoproteidfraktionen menschlicher Zwischenwirbelscheiben. Angaben in % des Trockengewichtes.

Fraktion	Hexosamin (total)	Neutralzucker (Orcin)	L-Fucose	Uronsäure (Carbazol)	Neuramin-Säure	N
I (2,5 Vol.Äthanol)	18,7	19,1	2,1	6,9	3,2	7,30
II(5 Vol. Äthanol)	15,2	16,7	3,2	0,05	4,7	6,90

Diskussion

Für eine quantitative Bewertung der Altersveränderungen wird häufig der Hexosamin/Hydroxyprolin-Quotient herangezogen, dessen signifikante Abnahme mit zunehmendem Lebensalter als Ausdruck einer Kollagenakkumulation bei gleichzeitiger Abnahme aminozuckerhaltiger Polysaccharide angesehen wird. Solche Untersuchungen liegen für Haut, Myocard, Aorta (35) und auch Zwischenwirbelscheiben des Menschen (14) sowie für verschiedene Knorpelgewebe der Ratte vor (36).

Die Änderungen des Kollagengehaltes betreffen allerdings in den meisten Fällen weniger den Absolutgehalt sondern das Verhalten der verschiedenen, durch ihre Löslichkeitseigenschaften charakterisierten Kollagenunterfraktionen. Besondere Bedeutung kommen dabei dem säure- (und alkali) löslichen Kollagen als metabolischer Vorstufe der Kollagenfaser zu, deren successive prozentuale Abnahme (bezogen auf den Gesamtkollagengehalt) in zahlreichen Untersuchungen sowohl für menschliche (Zentralsehne des Diaphragma, Haut (37, 38) wie für tierische Organe (Rippenknorpel, Lunge, Leber bei der Ratte (39, 40) und Froschhaut (41) gefunden wurde. Als Ursache werden nicht nur die Abnahme der Kollagensyntheserate in den betreffenden Mesenchymzellen sondern vor allem die Besonderheiten des extrazellulären Reifungsprozesses der Kollagenfibrille verantwortlich gemacht. Die zunehmende Vernetzung der Kollagenfibrille mit Transesterifizierungen zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen führt zu einer erhöhten Strukturstabilität, die sich in einer höheren Resistenz gegenüber Säurehydrolyse(42) oder - wie in vorliegenden Untersuchungen - in einer unvollständigen Solubilisation bei Druckerhitzung äußert. Dieser extrazelluläre Alterungsprozeß der Kollagenfibrille läßt sich auch elektronenoptisch verfolgen: Im Gelenkknorpel der Maus (43) geht das bei der Geburt noch lose Netzwerk primitiver Kollagenfasern mit zunehmendem Alter (bis 2 1/2 Jahre) in dichtgepackte Faserbündel über, die aus dickeren Einzelfasern bestehen. Die so entstehenden Makromoleküle sind zwar - wie Inkorporationsversuche mit ^{14}C-Glycin am Granulationsgewebe der Ratte (44)

zeigen - relativ stoffwechselinert, doch nimmt die mechanische Qualität der gealterten Kollagenfaser zu, deren Zugfestigkeit mehrfach höher ist als in jüngeren Lebensaltern. Eine Erklärung für diese progressive (nichtenzymatische?) Vernetzung der Kollagenfaser ist vorerst noch nicht möglich, bei der extremen Wärmeempfindlichkeit des säurelöslichen Kollagens muß jedoch auch eine durch die Körpertemperatur induzierte thermische Denaturierung in Betracht gezogen werden (37).

Der Kollagengehalt menschlicher Zwischenwirbelscheiben erfährt nach Angaben von Voruntersuchern einen geringen Altersanstieg (14, 45). In dem hier untersuchten Material bleibt die Summe des nach Autoclavextraktion löslichen und unlöslichen Kollagens nach Abschluß des Körperwachstums bei Bezug auf das fettfreie Trockengewebe annähernd konstant. Zieht man jedoch die für Alterungsvorgänge charakteristische und auch in menschlichen Bandscheiben beschriebene Abnahme des Wassergehaltes (17) in Betracht, so ergibt sich bei Umrechnung auf das Frischgewebe ein dem Wasserverlust entsprechenden Anstieg des Kollagengehaltes auch für das vorliegende Untersuchungsgut. Die hier beobachtete altersabhängige Zunahme einer unlöslichen Kollagenfraktion entspricht den bereits vorliegenden Erfahrungen (14).

Im Verhalten der sauren Mucopolysaccharide der Zwischenwirbelscheiben sind drei Veränderungen für die Altersvorgänge charakteristisch: Einmal nimmt der Gehalt der Gesamtmucopolysaccharide während des Alters ständig ab. Diese Abnahme scheint für alterndes Knorpelgewebe ein regelmäßiger Befund zu sein und wurde an Hand von Aminozuckeranalysen auch für menschlichen Rippenknorpel (46, 47), für Haut (35, 49) und Lunge (48) nachgewiesen. Für das vorliegende Untersuchungsgut wurde dies neben der Hexosaminanalyse auch durch quantitative Isolierung der sauren Gesamtmucopolysaccharide in den einzelnen Altersklassen gesichert, wobei eine Abnahme von 30 auf 18 % des Trockengewichtes zwischen dem 21. und 80. Lebensjahre festgestellt wurde. Eine Abnahme des Gehaltes an Mucopolysacchariden und deren Ersatz durch fibrilläre Elemente kann mithin als ein generelles Kennzeichen für Alterungsvorgänge im Bindegewebe angesehen werden.

Die zweite auffällige Veränderung betrifft die Verschiebung im prozentualen Anteil der sauren Mucopolysaccharide Keratosulfat und Chondroitinsulfat. War schon auf Grund einer differenzierten Aminozuckeranalyse mit selektiver Bestimmung des Glucosamin- und Galaktosaminanteils die Vermutung ausgesprochen worden, daß mit zunehmendem Lebensalter in den Zwischenwirbelscheiben das galaktosaminhaltige Chondroitinsulfat durch das glucosaminhaltige Keratosulfat ersetzt wird (14), so konnte diese Vermutung im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen durch die präparative Darstellung und chemische Analyse dieser beiden sauren Mucopolysaccharide endgültig bewiesen werden. Zwar sind die Verhältnisse im menschlichen Rippenknorpel ähnlich gelagert (46, 47) und auch im Knorpelgewebe des Huhnes und im Schädelknorpel des Dogfisches (50) weist der mit dem Alter ansteigende Galaktose/Glucoronsäure-Quotient auf analoges Verhalten hin, dennoch scheint dieser Befund keine allgemeine Gültigkeit zu besitzen. So kommt es z.B. bei der Ratte innerhalb eines Zeitraumes von 2 Jahren jedenfalls nicht zur Bildung von Keratosulfat (51). Zwar wird auch hier der altersabhängige Verlust eines galaktosamin-, uronsäure- und sulfathaltigen Mucopolysaccharids beobachtet, doch bleibt die Konzentration eines zweiten, ebenfalls galaktosamin- und uronsäurehaltigen, jedoch sulfatfreien Mucopolysaccharids, im gleichen Zeitraum konstant. Die Ursachen für Konzentrationsverschiebungen von Chondroitinsulfat und Keratosulfat im Laufe des Lebens müssen zweifellos in den Differenzen ihrer biologischen Halbwertszeit gesucht werden und lassen sich - jedenfalls für die Bandscheibe beim Kaninchen - z.T. dadurch erklären, daß die biologische Halbwertszeit für Keratosulfat mindestens 120 Tage, für das Chondroitinsulfat C jedoch in Abhängigkeit vom Lebensalter 3 - 5 Tage bzw. 28 - 30 Tage beträgt.

Ein dritter wichtiger hier mitgeteilter Befund ist die Veränderung im Gehalt der Chondroitinsulfat-Isomeren A und C als Funktion des Lebensalters. Die Tatsache, daß der Anteil des Chondroitinsulfat C im Gesamtchondroitinsulfat auf Kosten des Chondroitinsulfat A successiv ansteigt, führt unter Berücksich-

tigung der gleichzeitigen Abnahme des Gesamtchondroitinsulfatgehaltes zu dem Schluß, daß entweder dessen Synthese während des ganzen Lebens keine wesentliche Veränderung erfährt oder eine mögliche Verringerung der Syntheserate (für Chondroitinsulfat C) durch eine entsprechende Verlängerung der biologischen Halbwertszeit ausgeglichen wird. Untersuchungen über die Sulfataufnahme im Knorpelgewebe, die bei der Ratte eine altersabhängige Reduktion erfährt (52), sind in diesem Zusammenhang wenig aufschlußreich, da sie keine Differenzierung zwischen Keratosulfat, Chondroitinsulfat und dessen Isomeren erlauben.

Überrsschend ist auch das Ergebnis, daß im Faserknorpel der Zwischenwirbelscheiben eine Hyaluronsäurefraktion existiert und diese eine altersabhängige Zunahme erfährt; denn einmal ist das Vorkommen von Hyaluronsäure im Knorpelgewebe überhaupt unbekannt und zum anderen ist für die Hyaluronsäure eine altersabhängige Abnahme ihres Gehaltes typisch. Dies zeigte sich übereinstimmend bei der Untersuchung von Arteriengewebe (28), Lungen (48) und Haut (53, 54).

Analysen über die chemische Zusammensetzung von pathologisch veränderten Zwischenwirbelscheiben beim Bandscheibenprolyps (16) lassen eine bemerkenswerte Parallele zu den Altersveränderungen erkennen. In Anbetracht der Gleichartigkeit der Veränderungen, die beim Bandscheibenprolaps - jedoch in intensivierter Form - auftreten d.h. zu einem stärkeren Kollagenanstieg und einer extremen Reduktion der Gesamtmucopolysaccharide (auf 5 %) führen, muß der Bandscheibenprolaps als ein vorzeitiger und isolierter auf den Faserknorpel der Bandscheibe lokalisierter Alterungsprozeß bezeichnet werden.

Die Frage, ob Alterungsprozesse eine naturnotwendige Gesetzmäßigkeit darstellen, kann erst sinnvoll gestellt werden, wenn die auslösenden Ursachen bekannt sind. Die Abnahme des Zellgehaltes (55) und Abnahme der Stoffwechselaktivität dürften als alleinige Erklärung kaum ausreichend sein. Das gleiche gilt für Hypothesen, die mangelhafte Sauerstoffversorgung, unvollständige Elimination von Stoffwechselprodukten, hormonelle Isuffizienz oder Degenera-

tion des Zentralnervensystems als ursächliche Faktoren anschuldigen (35). Beachtung verdient in diesem Zusammenhang allerdings die kürzlich beschriebene Tatsache, daß Östrogen und Wachshumshormon die Halbwertszeit des Chondroitinsulfat C im Nucleus pulposus der Zwischenwirbelscheiben bei einjährigen Kaninchen (3 - 5 Tage) auf Werte verschieben konnten, die denen zwei Wochen alter Tiere (28 - 30 Tage) entsprachen (56), daß hier also durch exogene Hormonzufuhr eine "Gewebeverjüngung" experimentell ausgelöst werden konnte.

Zusammenfassung

Biochemische Altersveränderungen an menschlichen Zwischenwirbelscheiben wurden mit chemisch-analytischen und präparativen Methoden am Acetontrockengewebe untersucht. Zur Ermittlung der altersabhängigen Veränderungen des Kollagens und der strukturlosen Zwischenzellsubstanz wurden vergleichende quantitative Bestimmungen des Hydroxyprolin- und Hexosamingehaltes in verschiedenen Altersklassen durchgeführt. Die Charakterisierung der sauren und neutralen Mucopolysaccharide der Zwischenzellsubstanz erfolgte durch präparative Darstellung, chemische Identifizierung sowie durch Bestimmung ihrer physiko-chemischen Eigenschaften. Die Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

1.) Der Gesamtkollagengehalt bleibt nach einem Anstieg von 43,6 % bei der Geburt bis auf 50,9 % zwischen dem 1. und 2. Dezennium bis zum 80. Lebensjahr konstant, dagegen nimmt eine nach Druckerhitzung nicht lösliche Kollagenfraktion, deren Anteil 2 - 14 % des Gesamtkollagens ausmacht, vom 21. - 80. Lebensjahr von 0,9 auf 5,8 % des Trockengewichtes zu. Der Hexosamingehalt fällt nach Erreichen eines Maximalwertes zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr (7,25 %) im Laufe des Lebens auf 5,22 % ab.

2.) Dem Abfall des Hexosamingehaltes entspricht eine altersabhängige Reduktion der Gesamtmucopolysaccharide, die jedoch vorwiegend die sauren Mucopolysaccharide betrifft. Die nur 5 - 15 % der Gesamtmucopolysaccharide betragenden neutralen Mucopolysaccharide zeigen dagegen einen geringfügigen Altersanstieg.

3.) Die Zwischenwirbelscheiben enthalten als saure Mucopolysaccharide Chondroitinsulfat A und C, Keratosulfat und Hyaluronsäure. Keratosulfat und Chondroitinsulfat C, die den Hauptanteil der sauren Mucopolysaccharide bilden, werden in chemisch reiner Form dargestellt.

4.) Chondroitinsulfat A und C und Keratosulfat zeigen charakteristische altersabhängige Veränderungen ihres Verteilungsmusters. Während beim Neugeborenen Chondroitinsulfat über 90 % der sauren Mucopolysaccharide stellt, und Keratosulfat fehlt oder nur in geringen Konzentrationen vorhanden ist, kehrt sich das Verhältnis durch kontinuierlichen Chondroitinsulfatschwund und gleichzeitigen Keratosulfatanstieg mit zunehmendem Lebensalter um, so daß zwischen dem 61. und 80. Lebensjahr der Keratosulfatanteil (50 %) den Chondroitinsulfatanteil (46 %) übertrifft. Der Chondroitinsulfat/Keratosulfat-Quotient sinkt im Laufe des Lebens von 11,7 auf 0,92 ab.

5.) Außer der Reduktion des Gesamtchondroitinsulfatgehaltes zeigt der prozentuale Anteil der Chondroitinsulfatisomeren A und C altersabhängige Verschiebungen. Während das Verhältnis Chondroitinsulfat A zu Chondroitinsulfat C zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr 2 : 1 beträgt, werden zwischen dem 21. und 40. Lebensjahre ein Verhältnis von 1: 1 und dem 61. und 80. Lebensjahr ein Verhältnis von 2 : 1 gefunden.

6.) Die Veränderungen im Spektrum der sauren Mucopolysaccharide weisen eine so regelmäßige und enge Korrelation zum Lebensalter auf, daß sie eine biochemische Altersbestimmung erlauben.

Herrn Prof. Dr.Dr. G. W e i t z e l bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Physiologisch-chemischen Institut zu besonderem Dank verpflichtet.

Für die freundliche Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung bei seiner Bearbeitung möchte ich Herrn Prof. Dr. E. B u d d e c k e meinen verbindlichsten Dank sagen.

Literatur

1.) O. Bucher, Histol. u. mikrosk. Anatomie des Menschen, Huber, Bern, 1958

2.) F. Sieglbauer, Lehrbuch der normalen Anatomie des Menschen, Urban u. Schwarzenb., Wien, 1956

3.) Handbuch der speziellen Anatomie, O.Lubarsch u. F.Henke, J.Springer, Berlin, IX/3, 1937

4.) B.Sylven u. S. Paulson, C. Hirsch, O. Snellman, J.Bone and Joint Surg., 33 a, 333 (1951)

5.) O.A.Beadle, Council spec. Rep.Ser. 161, 5 (1931)

6.) M.B. Conventry, R.K.Ghormley u. J.W.Kernohan, J. Bone and Joint. Surg. 27, 105 (1945)

7.) K. Meyer, Modern Trends in Ophthalmology, London, p.71 (1948)

8.) R.D. Lillie, E.W. Emmart u. A.M. Laskey, Arch.Path. 52, 363 (1951) s.a.(4)

9.) H. Malmgren u. B. Sylvén, Biochim. biophysica Acata (Amsterdam) 9, 706 (1952)

10.) S. Gardell u. S. Rastgeldi, Acta chem. scand. 8, 362 (1954)

11.) K. Meyer, A. Linker, E.A. Davidson u. B. Weissmann, J.biol. Chemistry 205,611 (1953)

12.) S. Gardell, Acta chem. scand. 9, 1035 (1955)

13.) D.A.Hall, P.F.Lloyd, F.Happey, W.G.Horton u. A.Naylor, Nature 179, 1078 (1957)

14.) A. Hallen, Acta chem. scand. 12, 1869 (1958) 16, 705 (1962)

15.) C. Hirsch, S. Paulsen, B. Sylvén u. O. Snellmann, Acta orthop.scand. 22, 175 (1953)

16.) E.A. Davidsom u. B. Woodhall, J.biol. Chemistry 234, 2951 (1959)

17.) G. Hevelke u. H. Hevelke, Z.f.Altersforschung, 14, 271 (1960)

18.) N. Boas, J. biol. Chemistry, 204, 553 (1953)

19.) S. Gardell, Acta chem. scand. 7, 207 (1953)

20.) Z. Dische, J. biol. Chemistry, 167, 189 (1947)

21.) J. Tillmanns u. K. Philippi, Biochem. Z. 215, 36 (1929)

22.) Z. Dische u. L. Shettles, J. biol. Chemistry 175, 595(1948)

23.) H. Faillard, Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol.Chem. 307, 62(1957

24.) A.E. Beet, Nature (London) 175,514 (1955)

25.) W. Schöniger, Mikrochem.verein. Mikrochim. Acta 1956, 869

26.) R.E. Neumann u. M.A.Logan, J. biol. Chemistry 186,549 (1950)
184,229 (1950)

27.) H. Flaschka, Mikrochemie, 39, 38 (1952)

28.) E. Buddecke, Hoppe-Seyler's Z. f. Phys. Chemie 318, 33 (1960

29.) K. Meyer u. J.W. Palmer, J. biol. Chemistry 114, 689 (1936)

30.) E. Buddecke u. R. Drzeniek, Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chemie 327, 49 (1962)

31.) F. Hartmann u. G. Ziems, Z. f. Rheumaforschung 13, 307 (1954

32.) D. Kaplan u. K. Meyer, Nature 183, 1267 (1959)

33.) M.B. Mathews u. M. Inouye, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 53, 509 (1961)

34.) L.José, L.J. Strominger u. L.F. Leloir, J. biol. Chemistry 217, 959 (1955)

35.) B. Clausen, Lab. Invest. 11, 229 (1962)

36.) K.Y.T.Kao, W.E.Hitt, R.L. Dawson u. T.H.McGavack, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 110, 538 (1962)

37.) R.R.Kohn u. E. Rollerson, A.M.A. Arch. Path. 68,316 (1959)

38.) S. Bakerman, Nature 196, 375 (1962)

39.) K.Y.T. Kao, W.E.Hitt, R.L. Dawson u. T.H. McGavack, J.Gerontol. Abs. 16, 389 (1961)

40.) V. Kobrle u. M. Chvapil, Physiol. Bohemoslov. 11, 243 (1962)

41.) J. Brocas u. F. Verzar, Gerontologia 5, 228 (1961)

42.) M. Chvapil u. R. Zahradnik, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 40, 329 (1960)

43.) R. Sieberg, M. Sieberg, A. Vogel u. W. Wetterstein, Amer. J. Anat. 109, 251 (1961)

44.) H. Koblet u. E.H. Frieden, Proc.Soc. exp. Biol. Med.104, 624 (1960)

45.) P.E.G. Mitchell, N.G. Hendry u. W.Z. Billewicz, J. Bone and Joint Surg. 43 B, 141 (1961)

46.) D. Kaplan u. K. Meyer, Nature 183, 1267 (1959)

47.) R. Kuhn u. H.J. Leppelmann, Liebigs Ann. Chem. 611,254 (1958)

48.) E. Buddecke u. E. Ruff-Lichtenstein, Z. f.Silikoseforschung (i.Druck)

49.) R. Lagier u. B. Exer, Gerontologia, 4, 39 (1960)

50.) J.W. Lash u. M.W. Whitehouse, Arch. Biochem. Biophysics. 90, 159 (1960)

51.) B. Anderson u. T.T.Odell, J. Gerontol. 15, 249 (1960)

52.) L. Salvini, F. Grandonico, S. Viola u. S. Citi, Giorn. gerontol. 8, 629 (1960)

53.) G. Loewi u. K. Meyer, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 27, 453 (1958)

54.) K. Meyer, Polysaccharides in Biology, Vol. 4, Josiah Macy Foundation, New York 1958

55.) G. Nichols, jr. J. clin. Invest. 41, 1389 (1962)

56.) E.A. Davidson u. W. Small,Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 69, 445 (1963)

L e b e n s l a u f

Mein Vater ist der Baumeister Max Sziegoleit, meine Mutter dessen Ehefrau Erika, geb. Deuter. Ich wurde am 18. März 1935 in Insterburg/Ostpr. als 2. Kind von 6 Geschwistern geboren. Die Kriegsereignisse brachten uns 1944 zuerst nach Plauen im Vogtland, dann nach Greiz/Thüringen und schließlich nach Stuttgart, wohin mein Vater aus dänischer Internierung entlassen wurde. Hier trat ich 1948 in die Oberschule und beendete 1952 meine Schulausbildung mit dem Abschluß der mittleren Reife. Im selben Jahr begann ich eine Handwerkslehre als Schriftsetzer, die ich 1955 mit der Gesellenprüfung abschloß. Ich fand aber wenig Befriedigung in meinem Beruf; deshalb trat ich während meiner Lehrzeit in das Abendgymnasium in Stuttgart ein und holte 1958 das Abitur nach.

Im selben Jahr begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen. Nach zwei Semester legte ich die naturwissenschaftliche und nach weiteren drei Semestern die ärztliche Vorprüfung ab. Nach 6 klinischen Semestern habe ich am 13.12.1963 das medizinische Staatsexamen mit Erfolg abgeschlossen.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen